PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:
C12N 15/10

A1
(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/29562
(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 25. Mai 2000 (25.05.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/08091

(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Oktober 1999 (26.10.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 51 156.6

6. November 1998 (06.11.98) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Postfach, D-64271 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOLSCHUH, Karl [DE/DE]; Weinbergstrasse 16, D-64342 Seeheim-Jugenheim (DE). MICHELSEN, Uwe [DE/DE]; Am Drachenstein 17, D-69469 Weinheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD OF ISOLATING PLASMID DNA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

(57) Abstract

The invention relates to a method of isolating plasmid DNA from cultures of microorganisms using solid phase bodies. The method is characterized by the following steps: a) adjusting the culture of microorganisms to an acidic pH, mixing it with the solid phase bodies, incubating and separation, b) resuspending the microorganisms immobilized on the solid phase bodies, lysing them, mixing them with a neutralizing binding buffer, incubating the mixture, separating and discarding the solid phase bodies, c) again mixing the supernatant with solid phase bodies, incubating the mixture, separating it and eluting the plasmid DNA from the solid phase bodies by means of an elution buffer.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man a) die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt, b) die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindepuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft, c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien,	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	-	Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerum		Korea	PL	Polen		Zimoabwe
CN ·	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan	•	
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singarur		

WO 00/29562 PCT/EP99/08091

Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern.

5

10

15

In der Molekularbiologie werden Mikroorganismen (z.B. Escherichia coli, Salmonella typhimurium u.a.) seit langem für Klonierungsexperimente verwendet. Hierzu wird extrachromosomale DNA, die sogenannte Plasmid-DNA, als Vehikel für zu klonierende, spezifische DNA-Stücke eingesetzt. Eine alltägliche Aufgabenstellung für den Fachmann besteht darin, die richtige Bakterienpopulation mit dem gesuchten Plasmid-Klon zu finden. Verschiedene chemische Verfahren sind beschrieben, Plasmid-DNA aus Mikroorganismen zu isolieren. Allen diesen Methoden ist gemeinsam, daß zunächst die Mikroorganismen durch Zentrifugation abgetrennt werden, um das Nährmedium zu entfernen. Das Nährmedium muß möglichst quantitativ entfernt werden und der erhaltene Mikroorganismenniederschlag muß vollständig in einem Resuspensionspuffer resuspendiert werden.

20

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen, das zur Entfernung des Nährmediums keinen Zentrifugationsschritt benötigt.

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man
- a) die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt,
- die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindepuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft,

- c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.
- Als Festphasenkörper kommen Kieselgele, Silicate oder glasartige Materialien, vorzugsweise magnetische Festphasenkörper mit Kieselgeloberfläche in Frage, insbesondere magnetische Silica-Partikel.
- Überraschenderweise wurde gefunden, daß Bakterien unter bestimmten

 Pufferbedingungen an magnetisierbare Festphasenkörper mit Kieselgeloberfläche unspezifisch binden und direkt aus dem Nährmedium magnetisch abgetrennt werden können. Weiterhin wurde gefunden, daß die so
 eingefangenen Bakterien resuspendiert, lysiert und als kompakter magnetischer Niederschlag mitsamt der genomischen DNA ebenso abgetrennt
 werden können, wobei die Plasmid DNA im Überstand verbleibt. Die
 Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie alle Verfahrensschritte der
 Plasmid-Isolierung automatisierbar macht.
- Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise so durchgeführt, daß eine Bakterienkultur, die über Nacht in einem Wachstumsmedium inkubiert 20 wurde, mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen sauren pH-Wert eingestellt wird. Anschließend werden magnetische Partikel hinzugegeben, wenige Minuten inkubiert und die Partikel im magnetischen Feld abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln anhaftenden Bakterien in einem Resuspensionspuffer resuspendiert. Danach wird ein 25 Lysispuffer zugegeben, gemischt und wenige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; ein neutralisierender Bindepuffer (N-Bindepuffer) wird zugegeben, gemischt und die Partikel werden im magnetischen Feld abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Reagenzgefäß überführt, Partikel zugegeben, gemischt und im magnetischen Feld abgetrennt. Die Partikel mit der 30 gebundenen Plasmid-DNA werden mit Waschpuffer gewaschen und schließlich wird die Plasmid-DNA mit Elutionspuffer eluiert.

Bei den Mikroorganismenkulturen handelt es sich vorzugsweise um E. Coli oder E. Coli -Mutanten, wie W3110, JM109, RR1, XL-1 Blue u.a. Diese Kulturen werden in der Regel über Nacht z.B. in einem LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Kochsalz im Liter) bei 37 °C inkubiert.

5

10

Eine entsprechend hergestellte Kultur wird mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen pH-Bereich von 1 bis 4, vorzugsweise pH 2, eingestellt. Geeignete Puffer sind solche, die in diesem pH-Bereich eine ausreichende Pufferkapazität besitzen, z.B. Formiat-, Acetat-, Citratpuffer oder auch Säuren wie Salzsäure. 1 ml der Bakterienkultur wird z.B. mit 0,1 ml 1N Salzsäure angesäuert und mit 5-50 µl einer Suspension (50 mg/ml) von magnetischen Silica-Partikeln versetzt, eine Minute inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt. Es hat sich gezeigt. daß in der Regel 5-15 µl der Partikelsuspension ausreichen, um mehr als 50 % der Bakterien abzutrennen. Die Anzahl der hier verwendeten Partikel übersteigt die Anzahl der Bakterien circa um einen Faktor 10-30.

20

15

Die an den Partikeln anhaftenden Bakterien werden in einem Resuspensionspuffer resuspendiert. Der Puffer sollte in der Lage sein, einen pH-Wert im Bereich von 7 bis 9 aufrechtzuerhalten; ein geeigneter Resuspensionspuffer besteht z.B. aus Tris-HCI, EDTA und RNase A.

25

30

Die resuspendierten Bakterien werden mit einem Lysispuffer versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert. Der Lysispuffer besteht z.B. aus Natronlauge und SDS. Anschließend wird ein neutralisierender Bindepuffer (N-Bindepuffer) zugesetzt, gemischt und die Partikel im magnetischen Feld abgetrennt und verworfen. Der N-Bindepuffer sollte einen pH-Wert im Bereich von 4 bis 6 aufrechterhalten; ein geeigneter N-Bindepuffer besteht z.B. aus einem Guanidiniumsalz und Kaliumacetat. Beide Pufferkomponenten können jedoch auch getrennt und nacheinander eingesetzt werden (siehe Beispiel 2).

Der Überstand wird in ein neues Reagenzgefäß überführt, es werden erneut Partikel zugegeben, gemischt und die mit der Plasmid-DNA beladenen Partikel werden im magnetischen Feld abgetrennt und mit Waschpuffer gewaschen. Dieser Puffer sollte im pH-Bereich von 5 bis 7 puffern, wobei die DNA an den Partikeln gebunden bleibt. Ein geeigneter Waschpuffer besteht z.B. aus Tris-HCI und EDTA.

Die anschließende Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit einem Elutionspuffer. Der dazu verwendete Elutionspuffer sollte einen pH-Bereich von 7,5

bis 9,5, vorzugsweise 8 bis 9 aufrechterhalten. Geeignete Puffer sind z.B.

Tris-HCI-Puffer, Tricin, Bicin und andere Puffer, die in diesem pH-Bereich puffern, vorzugsweise Tris-HCI. Gegebenenfalls kann der Elutionspuffer Chelatoren wie EDTA und/oder andere Substanzen enthalten. Die Pufferkonzentration sollte 5 bis 10 mM, vorzugsweise etwa 10 mM betragen.

Gegebenenfalls kann der Puffer noch geringe Mengen EDTA, z.B. 1 mM, enthalten. Die so eluierte Nucleinsäure ist direkt, ohne weitere Reinigungsschritte, für molekularbiologische Anwendungen, wie z.B. für Ampifikationsreaktionen (PCR, NASBA) einsetzbar.

20 Beispiel 1

<u>Materialien</u>

Mikrozentrifugenröhrchen

Partikelsuspension: 50 mg/ml

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH8,0 / 10 mM EDTA / 5 mg/ml RNase A

25 Lysispuffer: 200 mM NaOH / 1 % SDS

N-Bindepuffer: 5.3 M Gua-HCI / 0.7 M Kaliumacetat, pH 4,8

Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 6,5 Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 8,5

Verfahrensschritte

- 1. Eine Bakterienkultur (1 ml) wird mit 0,1 ml 1N Salzsäure und 10 μl magnetischen Silica-Partikeln gemischt, eine Minute inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt,
- der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln haftenden
 Bakterien in 100 μl Resuspensionspuffer resuspendiert,
 - 3. 200 µl Lysispuffer werden hinzugegeben, gemischt und 5 Minuten inkubiert,
 - 4. 400 μl N-Bindepuffer werden hinzugegeben, gemischt und die Partikel abgetrennt,
 - 5. der Überstand wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt,
 - 6. es werden 10 µl Partikelsuspension hinzugegeben, gemischt und die Partikel werden abgetrennt; der Überstand wird verworfen,
 - 7. die Partikel werden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

Beispiel 2

10

15

30

Materialien

Mikrozentrifugenröhrchen

20 Partikelsuspension: 50 mg/ml

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH8,0 / 10 mM EDTA / 5 mg/ml RNase A

Lysispuffer: 200 mM NaOH / 1 % SDS

Neutralisierungspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Bindungspuffer: 5 M Guanidiniumthiocyanat

25 Waschpuffer: 10 mM Tris-HCI / 1 mM EDTA, pH 6,5

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCI / 1 mM EDTA, pH 8,5

Verfahrensschritte

1 Eine Bakterienkultur (1 ml) wird mit 50 μl 1N Salzsäure und 10 μl magnetische Silica-Partikeln gemischt, fünf Minuten inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt,

- 2. der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln haftenden Bakterien in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert,
- 3. 200 µl Lysispuffer werden hinzugegeben, gemischt und 5.Minuten inkubiert,
- 5 4 200 µl Neutralisierungspuffer werden hinzugegeben, gemischt und die Partikel mitsamt dem Niederschlag abgetrennt,
 - 5. der Überstand wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt,
 - 6. es werden das gleiche Volumen Bindepuffer sowie mindestens 10 μl Partikelsuspension hinzugegeben, gemischt und die Partikel werden abgetrennt; der Überstand wird verworfen,
 - 7. die Partikel werden zweimal gewaschen und die Plasmid DNA mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

10

20

10

Patentansprüche

- 1. Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt,
 - b) die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindepuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft,
 - c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismen Escherichia coli oder E. Coli-Mutanten verwendet werden.
- Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet,
 daß als Festphasenkörper magnetische Festphasenkörper mit Kieselgeloberfläche verwendet werden.
 - 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Festphasenkörper Kieselgele, Silicate oder glasartige Materialien verwendet werden.
 - Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Festphasenkörper Silica-Partikel verwendet werden.

- Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der saure pH-Wert mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen pH-Wert im Bereich von 1 bis 4 eingestellt wird.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert mit Salzsäure eingestellt wird.

15

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter onal Application No PCT/EP 99/08091

	·		·
A. CLASSIF IPC 7	C12N15/10		
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classificati	on and IPC	
B. FIELDS			
Minimum do IPC 7	cumentation searched (classification system followed by classification ${\tt C12N}$	symbols)	-
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that suc	ch documents are included in the fields sea	arched
Electronic da	ata base consulted during the international search (name of data base	e and, where practical, search terms used)	
C. DOCUME	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	vant passages	Relevant to claim No.
X	DE 195 20 398 A (BOEHRINGER MANNH 12 December 1996 (1996-12-12) page 4, line 50 - line 59 page 6, line 11 - line 39; claims figure 1		1-5
x	US 5 075 430 A (LITTLE MICHAEL C) 24 December 1991 (1991-12-24)		1,2 3-7
Α	column 1, line 36 - line 65		5 /
Α	WO 92 07863 A (DIAGEN INST MOLEKU 14 May 1992 (1992-05-14) claims 1-15	LARBIO)	1-7
Α	US 5 051 189 A (FARRAH SAMUEL R) 24 September 1991 (1991-09-24) table 7	· /	1-7
	-	•	
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members are listed	in annex.
"A" docum consi "E" earlier filing "L" docum which citatic citatic "O" docum other "P" docum later	nent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance document but published on or after the international date ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means therefore the published prior to the international filling date but than the priority date claimed	"T" later document published after the interest or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the document of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or ments, such combination being obvious the art. "&" document member of the same paternians.	the application but every underlying the claimed invention to be considered to coument is taken alone claimed invention eventive step when the ore other such docu- us to a person skilled family
	a actual completion of the international search 3 April 2000	Date of mailing of the international se $07/04/2000$	амперис
	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer van Klompenburg,	W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ional Application No
PCT/EP 99/08091

		PCI/EP 99	,
	NOTION DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Delevent to alsin No.
Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
A	DE 43 07 262 A (BERGEMANN CHRISTIAN) 8 September 1994 (1994-09-08) column 2, line 21 - line 25; claim 8		1-7
	·		
	·		
, A ⁷			
	·		
			·
		٠	
		÷'	
•		•	
		•	
			·

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inti ional Application No
PCT/EP 99/08091

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19520398	A	12-12-1996	AU 7071	15 B	01-07-1999
02 13020030	••		AU 630079		09-01-1997
			CA 22238	21 A	27-12-1996
			CN 11922	17 A	02-09-1998
			WO 96418	11 A	27-12-1996
			EP 08378	71 A	29-04-1998
		•	JP 1150930	64 T	17-08-1999
			NO 9757	72 A	06-02-1998
			NZ 3116	48 A	30-08-1999
US 5075430	Α	24-12-1991	NONE		
WO 9207863	Α	14-05-1992	DE 40340	36 A	30-04-1992
3207000		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	DE 591054		08-06-1995
			EP 05552	70 A	18-08-1993
			US 56521	41 A	29-07-1997
			US 60201	86 A	01-02-2000
US 5051189	Α	24-09-1991	US 54320	77 A	11-07-1995
DE 4307262	- A	08-09-1994	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte. .onales Aktenzeichen PCT/EP 99/08091

A KLASSIE	IZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12N15/10		
	•		
			·
Nach der Inte	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	sifikation und der IPK	
B. RECHER	RCHIERTE GEBIETE		
	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol	le)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
IPK 7	C12N	,	
Recherchiert	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
	•	•	·
Während de	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verwendete S	Suchbeariffe)
Warmond do	, memalistas resistant kanada senti sinasi a Bateriaan (m		
<u>}</u> .			•
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie'	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
			······································
x	DE 195 20 398 A (BOEHRINGER MANNH	FTM GMRH)	1-5
^	12. Dezember 1996 (1996-12-12)	EIM GMBII)	1 3
	Seite 4, Zeile 50 - Zeile 59		
	Seite 6, Zeile 11 - Zeile 39; Ans	prüche	
, k,	1-13; Abbildung 1	pr dene	
		•	
х	US 5 075 430 A (LITTLE MICHAEL C)	,	1,2
'	24. Dezember 1991 (1991-12-24)		*,-
A	Spalte 1, Zeile 36 - Zeile 65		3-7
'			
A I	WO 92 07863 A (DIAGEN INST MOLEKU	LARBIO)	1-7
	14. Mai 1992 (1992-05-14)	•	
	Ansprüche 1-15		
Α	US 5 051 189 A (FARRAH SAMUEL R)		1-7
	24. September 1991 (1991-09-24)		
	Tabelle 7		
		,	
	<u>.</u>	·/	
LY Wait	tors Variation the control of the Co	Sighe Anhana Patentamilla	
	iere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Siehe Anhang Patentfamille	
° Besonde re	Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem	internationalen Anmeldedatum
	ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	oder dem Prioritätsdatum veröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu	r zum Verständnis des der
1	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen	Erfindung zugrundellegenden Prinzips Theorie angegeben ist	oder der ihr zugrundeliegenden
1		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlik	
l schein	ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	erfinderischer Tätigkeit beruhend betra	chtet werden
soil oc	en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besonderer Beder kann nicht als auf erfindenscher Tätigk	Itung; die beanspruchte Erfindung
ausge	iführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in	einer oder mehreren anderen
eine B	Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	diese Verbindung für einen Fachmann	
	intlichung, die vor dem internationalen. Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derseiber	Patentfamilie ist
Datum des	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
		•	
3	. April 2000	07/04/2000	
	·		
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter	
1	NL – 2280 HV Rijswijk		
1	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	van Klompenburg,	W
	•	1	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte. .onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08091

		PCT/EP 99	7/08091	
.(Fortsetz (ategorie ³	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	enden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
Ą	DE 43 07 262 A (BERGEMANN CHRISTIAN) 8. September 1994 (1994-09-08) Spalte 2, Zeile 21 - Zeile 25; Anspruch 8		1-7	
•				
	·			
	•			
.				
			,	
			·	
·				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen PCT/EP 99/08091

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokum		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19520398	Α	12-12-1996	AU 707115 B AU 6300796 A CA 2223821 A CN 1192217 A W0 9641811 A EP 0837871 A JP 11509364 T N0 975772 A NZ 311648 A	09-01-1997 27-12-1996 02-09-1998 27-12-1996 29-04-1998 17-08-1999 06-02-1998
US 5075430	Α	24-12-1991	KEINE	
WO 9207863	Α	14-05-1992	DE 4034036 A DE 59105403 D EP 0555270 A US 5652141 A US 6020186 A	08-06-1995 18-08-1993 29-07-1997
US 5051189	Α	24-09-1991	US 5432077 A	11-07-1995
DE 4307262		08-09-1994	KEINE	